

Влияние ингибиторов фосфодиэстеразы-5 на альвеолярный кровоток легочного трансплантата

П.К. Яблонский¹, О.Н. Резник², А.Е. Скворцов², В.Е. Милехин¹

¹ ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии»

Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург,

² ГБОУ «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург

Контакты: Андрей Евгеньевич Скворцов, skvortsov.spb@gmail.com

Трансплантация легких – эффективный радикальный хирургический способ лечения хронических заболеваний легких в терминальной стадии. Применение препаратов, оказывающих вазоплегическое действие на гладкую мускулатуру сосудистого русла малого круга кровообращения, до начала консервации и оценка функционального состояния микроциркуляторного русла органа в постреперфузионном периоде могут позволить улучшить клинические результаты таких операций и увеличить сроки функционирования легочного трансплантата в организме реципиента.

Использованы 54 животных (немецкая полевая свинья массой тела $32,3 \pm 0,6$ кг, мужского пола), из них 42 (доноры и реципиенты) были разделены на три группы в зависимости от способа консервации. Для оценки параметров микроциркуляции применяли ортогонально поляризованную спектральную видеомикроскопию (ОСВМ).

При введении в легочный ствол ингибитора фосфодиэстеразы-5 (ФДЭ-5) за 20 мин до начала консервации выявлено достоверное увеличение суммарной длины открытых капилляров на одно альвеолярное поле ($486,3 \pm 258,1$ к исходному $240,8 \pm 127,9$ мкм; $p < 0,001$) и индекса капиллярного кровотока альвеол – ИКК ($515,0$ к исходному $249,2$ мкм/мкм²; $p < 0,001$), а также среднего диаметра альвеол – сДА ($91,2 \pm 52,3$ к исходному $85,1 \pm 41,5$ мкм; $p < 0,05$).

Применение ингибитора ФДЭ-5 за 20 мин до начала перфузии легочного трансплантата консервирующим раствором улучшает оксигенирующую способность трансплантированного легкого. ОСВМ является достоверным методом оценки и мониторинга параметров микроциркуляции легочной ткани *in vivo*.

Ключевые слова: ишемически реперфузионное повреждение, трансплантация легких, ортогонально поляризованная спектральная видеомикроскопия.

The effect of phosphodiesterase-5 inhibitors on the alveolar blood flow in the pulmonary graft

P.K. Yablonskiy¹, O.N. Reznik², A.E. Skvortsov², V.E. Milehin¹

¹ FSBI «St. Petersburg Research Institute of Phthiopulmonology»

Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg,

² SEI «The First St. Petersburg State Medical University named after I.P. Pavlov»

Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg

Lung transplantation – an effective way to radical surgical treatment of chronic lung disease in the terminal stage. The use of drugs with extending effect on vascular smooth musculature of the pulmonary circulatory system, prior to conservation and assessment of the functional state of the microvasculature in the postreperfusion period may result in improved clinical outcomes of such operations and increase the duration of the functioning of the lung transplant in the body of the recipient.

Fifty four animals were used (German Field Pig, $32,3 \pm 0,6$ kg, male). Forty two animals (donors and recipients) were divided into three groups according to the method of conservation. Orthogonally polarized spectral video microscopy (OPSVM) was applied for estimation the parameters of microcirculation.

Injection of a phosphodiesterase-5 (PDE-5) inhibitor into the pulmonary trunk at 20 min before conservation significantly increases the total length of open alveolar capillaries per field ($486,3 \pm 258,1$ mkm in comparison to the initial $240,8 \pm 127,9$ mkm; $p < 0,001$) and the index of capillary blood flow of the alveoli ($515,0$ in comparison to the initial $249,2$ mkm/mkm²; $p < 0,001$), also the increase of the mean diameter of the alveoli was found ($91,2 \pm 52,3$ mkm in comparison to the initial $85,1 \pm 41,5$ mkm; $p < 0,05$).

The use of PDE-5 inhibitor at 20 min before the start of perfusion of lung transplant with conservation solution improves the oxygenizing ability of the transplanted lung. OPSVM is a reliable method for assessing and monitoring the parameters of microcirculation of lung tissue *in vivo*.

Key words: ischemic reperfusion injury, lung transplantation, orthogonally polarized spectral video microscopy.

Введение

Трансплантация легких (ТЛ) является эффективным способом лечения терминальных стадий хронических заболеваний легких [1]. Опыт мировой клинической практики насчитывает более 3 500 таких операций. Выживаемость реципиентов после ТЛ составляет 53% в течение 5 лет и 30% в течение 10 лет (медиана выживаемости – 5,5 года) [2].

Одной из основных причин неудач в раннем послеоперационном периоде у реципиентов легкого является дисфункция легочного трансплантата. Несмотря на оптимизацию протоколов защиты донорского легкого, частота встречаемости данного осложнения остается в пределах 15–30% [3, 4], что, в свою очередь, определяет клинические результаты таких операций и значительно снижает сроки функционирования легочного трансплантата в отдаленном послеоперационном периоде [5].

Ключевой причиной развития дисфункции трансплантата служит ишемически-реперфузионное повреждение ткани легкого, преимущественно вследствие травмы эндотелия сосудов в период ишемии. Именно поэтому поиск путей повышения противоишемической защиты легочного трансплантата на этапе его изъятия и последующего хранения, а также профилактика ишемически-реперфузионного повреждения являются актуальной задачей современной трансплантологии [6].

В снижении степени ишемически-реперфузионного повреждения легочного трансплантата значимую роль играют профилактика спазма гладкомышечной мускулатуры, интерстициального отека и удаление активированных форм лейкоцитов из микроциркуляторного русла донорского органа во время перфузии консервирующим раствором [7, 8].

В свете данной проблемы особый интерес представляет группа препаратов, оказывающих вазоплегическое действие на гладкую мускулатуру сосудистого русла, преимущественно малого круга кровообращения. К таким препаратам относится селективный ингибитор ФДЭ-5, который уже успешно применяют в лечении легочной гипертензии [9], в том числе и у пациентов в состоянии гипоксии [10]. Описанное свойство данного препарата может быть использовано для достижения равномерного распределения консервирующего раствора в донорском легком, что позволит обеспечить его более качественную за-

щиту от ишемии в период холодового хранения. Также интересным представляется оценка влияния ингибитора ФДЭ-5 на микроциркуляцию легочной ткани.

Наряду с применением фармакологического воздействия на донорский орган во время консервации, нельзя не упомянуть об одном из наиболее перспективных направлений решения проблемы ишемически-реперфузионного повреждения трансплантата, а также диагностики его функционального состояния до трансплантации, – способе изолированной аппаратной перфузии легких *ex vivo* [11]. Данный метод уже применяется в качестве экспериментальной модели аллотрансплантации легкого на животных и позволяет успешно изучать функциональные особенности легочного трансплантата во время перфузии, а также, по данным некоторых авторов, может быть использован для восстановления функционального состояния субоптимальных легочных трансплантатов [12]. Существуют сообщения о первых успешных применениях изолированной аппаратной перфузии легких и в клинической практике [13–15]. Сочетание аппаратной перфузии и визуальных методов оценки состояния микроциркуляторного русла может открыть новые перспективы в вопросе определения пригодности донорских легких к трансплантации и степени ишемически-реперфузионного повреждения микроциркуляторного русла, что, в свою очередь, может позволить проводить прогнозирование результатов пересадок [16].

В настоящее время экспериментальная модель аллотрансплантации легкого, впервые предложенная *Juvenelle* в 1951 г., хорошо изучена, однако она не дает ответа на ряд прикладных вопросов функциональной оценки состояния легочного трансплантата в раннем реперфузионном периоде. Необходимо отметить также, что на сегодняшний день недостаточно изучены особенности микроциркуляции легочного трансплантата *in vivo* [17–19].

Проведенные ранее эксперименты продемонстрировали прямую зависимость между нарушениями микроциркуляции трансплантата и уровнем его функционального состояния [20]. Основными лимитирующими факторами визуализации параметров микроциркуляции солидных органов *in vivo* до недавнего времени были ограничение доступа к поверхности исследуемой ткани, большой размер оборудования и необходимость использования флюоресцентных красителей. ОСВМ позволяет проводить количествен-

ную оценку параметров микроциркуляции без использования флюоресцентных красителей [21].

Ранняя диагностика степени реперфузионной травмы, которая частично отражается динамическим состоянием микроциркуляторного русла, безусловно, является важным направлением исследований функционального состояния донорского органа после запуска кровотока в организме реципиента и дает возможность своевременно проводить его коррекцию, что в последующем может определять длительность функционирования легочного трансплантата. В этом отношении результаты, полученные при интраоперационной ОСВМ трансплантата, могут стать критерием оценки степени реперфузионного повреждения донорского легкого [22, 23].

Возможность фармакологического воздействия на состояние сосудистого русла во время консервации донорского (свиного) легкого и поиск оптимальных методов оценки функционального состояния органа после трансплантации легкого в основу настоящего исследования.

Материал и методы

В рамках данного исследования были использованы 54 животных (немецкая полевая свинья массой тела $32,3 \pm 0,6$ кг, мужского пола).

Экспериментальный протокол был проверен и утвержден Этическим исследовательским комитетом по ветеринарии Медицинской школы Эссена. Все животные были анестезированы и оперированы, исходя из требований «Principles of Laboratory and Animal Care» и «Guide for the Care and Use of Laboratory animals», подготовленных в Исследовательском институте по работе с лабораторными животными Национального института здравоохранения (NIH publication no. 85-23, revised 1985).

Исследование включало три этапа: первый (5 животных) – отработка модели односторонней аллотрансплантации легкого; второй (7 животных) – исследование влияния ингибитора ФДЭ-5 на легочную гемодинамику и альвеолярную микроциркуляцию *in vivo*; третий (42 животных: одна половина животных была использована в качестве доноров, другая – в качестве реципиентов) – исследование влияния применения ингибитора ФДЭ-5 на функциональное состояние легочного трансплантата в раннем реперфузионном периоде, где животные были разделены на три экспериментальные группы в зависимости от способа консервации (I – консервация буфер-ста-

билизированным раствором декстрана с низким содержанием калия LPD (*low potassium dextran*); II – раствор LPD и 0,15 мг/кг водного раствора ингибитора ФДЭ-5; III – водный раствор ингибитора ФДЭ-5 в дозе 0,15 мг/кг вводили в ствол легочной артерии за 20 мин до начала перфузии раствором LPD).

Оценку параметров микроциркуляции легкого осуществляли при помощи ортогонально поляризованного спектрального видеомикроскопа *CytoscanTM* (*Cytometrics, Inc., Philadelphia, PA, USA*). Видеозапись исследования проводили при помощи видеомагнитофона JVC (*HR-DD857MSSVHSNTFS*). Суммарную протяженность всех функционирующих капилляров на альвеолярном поле, средний диаметр капилляров, сДА и среднюю линейную скорость движения эритроцитов определяли при помощи программы анализа видеоизображения *CapiScope* (*CapiScopeSoftware, UK*). ИКК вычисляли по формуле:

ИКК = суммарная длина функционирующих капилляров исследуемой альвеолы, мкм/площадь альвеолы, мкм²/среднее значение альвеолярной площади, мкм².

Протокол операции. Премедикацию животных осуществляли сочетанием инъекций кетамина, стреснила и атропина, затем анестезию поддерживали инфузией дипривана и фентанила. Искусственную вентиляцию легких (*Fabius GS, Drager, Германия*) проводили в стандартизованном режиме контроля давления. Выполняли мониторинг гемодинамики, газового состава крови и параметров микроциркуляции. С целью профилактики острого отторжения трансплантата внутривенно вводили метилпреднизолон. Эксплантацию легочного комплекса выполняли единым блоком, перед изъятием легкие раздували (1/2 объема), главный бронх прошивали аппаратным швом для достижения герметичности. После изъятия легочный трансплантат хранили в течение 24 ч при температуре 6–8°C в растворе LPD. У реципиентов первым этапом выполняли левостороннюю пневмонэктомию. Имплантацию донорского легкого проводили последовательно, начиная с формирования бронхиального анастомоза по типу «конец-в-конец», затем – анастомоза легочной артерии по типу «косая линия». Для формирования анастомоза легочных вен использовали донорскую площадку предсердия. Наблюдение животных производили в течение 6 ч острого эксперимента, после чего путем внутрисердечной инъекции 3% раствора тетракаина

гидрохлорида достигали остановки сердечной деятельности.

Показатель соотношения влажного/сухого компонента ткани легкого определяли по окончании наблюдения, результат рассчитывали из отношения влажного компонента к сухому остатку (экспозиция в сухожаровом шкафу при температуре 65°C в течение 24 ч).

Полученные результаты были проанализированы дисперсионным анализом повторных измерений (ANOVA) и парным Т-тестом, для сравнения пропорций использовали точный критерий Фишера. Все данные были анализированы с помощью статистической программы SPSS-science (Sigma Stat 3.0 and Sigma Plot 8.0).

Результаты и обсуждение

При отработке модели левосторонней аллотрансплантации легкого на крупном животном была отмечена ключевая необходимость выполнения «косого» анастомоза легочной артерии. При использовании стандартного циркулярного анастомоза «конец-в-конец» после пережатия артерии контралатерального легкого возникал гемодинамически значимый (40–50 мм рт.ст.) градиент в зоне анастомоза, что критически отражалось на гемодинамике в целом.

Применение методики ОСВМ позволило с высокой степенью достоверности оценить изменения параметров легочной микроциркуляции и провести корреляцию с параметрами системной гемодинамики в эксперименте *in vivo*.

Результаты второго этапа эксперимента подтвердили воздействие ингибитора ФДЭ-5 на гемодинамику и микроциркуляцию легкого. К 4-й мин эксперимента после введения ингибитора ФДЭ-5 происходило статистически значимое снижение среднего давления в легочной артерии с 21,5±0,7 до 18,2±0,9 мм рт.ст. ($p<0,05$) и легочного сосудистого сопротивления – со 172,8±23,7 до 136,0±13,9 дин·с·см⁻⁵ ($p<0,05$). Также было выявлено статистически значимое увеличение суммарной длины открытых капилляров на одно альвеолярное поле (486,3±258,1 к исходному 240,8±127,9 мкм; $p<0,001$) и ИКК (515,0 к исходному 249,2 мкм/мкм²; $p<0,001$), а также сДА (91,2±52,3 к исходному 85,1±41,5 мкм; $p<0,05$).

При морфологической оценке изменения среднего значения диаметров открытых альвеолярных капилляров в ответ на введение ингибитора ФДЭ-5 отмечено статистически значимое увеличение доли капилляров с диаметром менее

8 мкм («истинных капилляров») – с 72,0±9,8 до 88,1±7,2% ($p<0,001$) по отношению к общему количеству исследованных микрососудов от 5 до 22 мкм, что позволило сформулировать предположение о новом механизме действия ингибитора ФДЭ-5, возможно, связанном с тотальным расслаблением прекапиллярных сфинктеров; также была обнаружена реактивность ФДЭ-5 после гипоксии, локализовавшаяся не только в легочных сосудах, но и в стенках альвеол.

Результаты третьего этапа эксперимента подтвердили выдвинутую гипотезу об эффективности применения ингибитора ФДЭ-5 за 20 мин до перфузии консервирующим раствором с целью создания оптимальных условий для улучшения качества перфузии им легочного трансплантата. Устранение спазма прекапиллярных сфинктеров капиллярной сети альвеол создавало благоприятные условия для гомогенного распределения консервирующего раствора в ткани донорского легкого, что способствовало максимальному удалению из периферического русла клеточного и белкового компонентов донорской крови – основного субстрата внутрисосудистого повреждения эндотелия. В результате это привело к увеличению индекса оксигенации трансплантированного легкого (рис. 1), что следует расценивать как улучшение защиты от ишемически-реперфузионного повреждения.

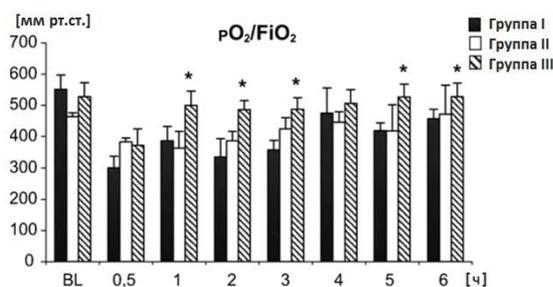


Рис. 1. Индекс оксигенации (pO₂/F_iO₂) в экспериментальных группах; все значения среднего ± среднее квадратическое отклонение

* Статистически значимое различие по сравнению с I группой ($p<0,05$).

Средний диаметр альвеолярных капилляров статистически значимо снижался на протяжении всего эксперимента во всех трех группах, однако статистически значимо меньшего значения он был только во II группе в течение 5-го и 6-го ч эксперимента. ИКК был статистически значимо

выше в III группе через 6 ч после начала реперфузии легочного трансплантата – $10,1 \pm 1,1$ против $5,2 \pm 0,4$ мкм/мкм² в I группе; $p < 0,05$ (рис. 2).

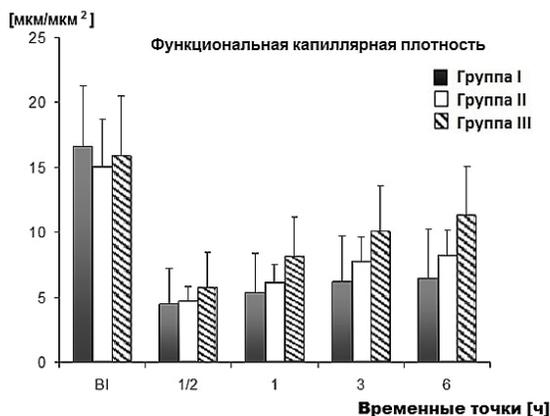


Рис. 2. Динамика изменения ИКК кровотока в экспериментальных группах; все значения среднего \pm среднее квадратическое отклонение
* Статистически значимое различие ($p < 0,05$)

Добавление ингибитора ФДЭ-5 непосредственно в консервирующий раствор привело к высокой летальности экспериментальных животных от развития острого реперфузионного отека легочного трансплантата. Это могло быть обусловлено длительным внутрисосудистым воздействием ингибитора ФДЭ-5 (24 ч периода холодной ишемии), что в сочетании с ишемической травмой эндотелия приводило к полной потере тонуса капиллярного русла легочного трансплантата с последующим формированием картины острого интерстициального отека легочной ткани. Это подтверждалось и достоверно большим содержанием жидкостного компонента в ткани легкого у животных II группы, и морфологической картиной прогрессирующего интерстициального отека легких с прогрессирующей редукцией альвеолярной структуры, вплоть до полного ателектаза.

Методика мониторинга параметров периферической микроциркуляции *in vivo* в режиме реального времени (ОСВМ или современные аналоги данной технологии) дает возможность

предложить в перспективе качественно новый принцип оценки системной макро- и микрогемодинамики. Возможности динамической оценки спазма или экстравазации в периферическом русле *in vivo* позволят выявить алгоритмы контроля в системах экстра- и интракорпорального кровообращения на уровне оценки тканевой перфузии, что может служить индикатором выбора дозировки вазопрессорной поддержки в раннем реперфузионном периоде.

Выводы

1. Модель односторонней аллотрансплантации легкого на крупном животном (свинья) в остром эксперименте является адекватной для изучения и моделирования патофизиологических механизмов ишемически-реперфузионного повреждения легочного трансплантата с возможностью мониторинга параметров микроциркуляции *in vivo*.

2. ОСВМ служит достоверным методом оценки и мониторинга параметров микроциркуляции легочной ткани *in vivo* в режиме реального времени, что позволяет изучать и применять математическое моделирование изменений параметров микро- и макрогемодинамики капиллярной сети легких.

3. Использование ингибитора ФДЭ-5 качественно изменяет перфузию капиллярного русла альвеол, вызывая тотальное вовлечение в кровоток нефункционирующих капилляров за счет расслабления прекапиллярных сфинктеров.

4. Применение ингибитора ФДЭ-5 за 20 мин до начала перфузии консервирующим раствором обеспечивает более качественную защиту донорского легкого от ишемически-реперфузионного повреждения, а в раннем посттрансплантационном периоде – увеличение индекса оксигенации легочного трансплантата.

5. Объединение метода изолированной аппаратной перфузии *ex vivo* и ОСВМ позволяет создать универсальный метод оценки качества легочного трансплантата, что даст возможность прогнозировать исходы пересадок до трансплантации.

Литература

1. Первая трансплантация легких в НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского / М.Ш. Хубутия [и др.] // Трансплантология. – 2011. – № 2–3. – С. 5–9.
2. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-eighth Adult Lung and Heart – Lung Transplant Report – 2011 / J.D. Christie [et al.] // J. Heart Lung Transplant. – 2011. – Vol. 30, N 10. – P. 1104–1122.
3. Трансплантология: Руководство для врачей / Под ред. В.И. Шумакова. – М.: МИА, 2006. – 544 с.
4. Clinical risk factors for primary graft dysfunction after lung transplantation / J.M. Diamond [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2013. – Vol. 187, N 5. – P. 527–534.
5. Ahmad, S. Pulmonary complications of lung transplantation / S. Ahmad, O.A. Shlobin, S.D. Nathan // Chest. – 2011. – Vol. 139, N 2. – P. 402–411.
6. The impact of prolonged cold preservation on the graft function and gene expression levels in an experimental lung transplantation model / O. Yoshida [et al.] // Surg. Today. – 2013. – Vol. 43, N 1. – P. 81–87.
7. Cellular electrophysiologic and mechanical evidence of superior vascular protection in pulmonary microcirculation by Perfadex compared with Celsior / M. Wu [et al.] // J. Thorac. Cardiovascular Surg. – 2009. – Vol. 137, N 2. – P. 492–498.
8. Normothermic perfusion of donor lungs for preservation and assessment with the Organ Care System Lung before bilateral transplantation: a pilot study of 12 patients / G. Warnecke [et al.] // Lancet. – 2012. – Vol. 380, N 9856. – P. 1851–1858.
9. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension / N. Galie [et al.] // Eur. Heart J. – 2009. – Vol. 30, N 20. – P. 2493–2537.
10. Sildenafil versus endothelin receptor antagonist for pulmonary hypertension (SERAPH) study / M.R. Wilkins [et al.] // Am. J. Resp. Crit. Care. – 2005. – Vol. 171, N 11. – P. 1292–1297.
11. Ex vivo rehabilitation of non-heart-beating donor lungs in preclinical porcine model: delayed perfusion results in superior lung function / D.P. Mulloy [et al.] // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. – 2012. – Vol. 144, N 5. – P. 1208–1215.
12. Ex vivo lung reconditioning: a new era for lung transplantation / A.W. Mariani, P.M. P go-Fernandes, L.G. Abdalla, F.B. Jatene // J. Bras. Pneumol. – 2012. – Vol. 38, N 6. – P. 776–785.
13. Transplantation of initially rejected donor lungs after ex vivo lung perfusion / A. Wallinder [et al.] // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. – 2012. – Vol. 144, N 5. – P. 1222–1228.
14. First human transplantation of a nonacceptable donor lung after reconditioning ex vivo / S. Steen [et al.] // Ann. Thorac. Surg. – 2007. – Vol. 83, N 6. – P. 2191–2194.
15. Experience with the first 50 ex vivo lung perfusions in clinical transplantation / M.J. Cypel [et al.] // Thorac. Cardiovasc Surg. – 2012. – Vol. 144, N 5. – P. 1200–1206.
16. Comparison of lung preservation solutions in human lungs using an ex vivo lung perfusion experimental model / I.L. Medeiros [et al.] // Clinics (Sao Paulo). – 2012. – Vol. 67, N 9. – P. 1101–1106.
17. A new porcine model of reperfusion injury after lung transplantation / S.C. Clark [et al.] // Lab. Anim. – 1999. – Vol. 33, N 2. – P. 135–142.
18. A new model for the assessment of lung allograft ischemia/reperfusion injury / S. Hillinger [et al.] // J. Invest. Surg. – 2000. – Vol. 13, N 1. – P. 59–65.
19. Pretreatment strategy with adenosine A2A receptor agonist attenuates reperfusion injury in a preclinical porcine lung transplantation model / D.J. LaPar [et al.] // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. – 2011. – Vol. 142, N 4. – P. 887–894.
20. In vivo imaging of human pancreatic microcirculation and pancreatic tissue injury in clinical pancreas transplantation / K.D. Schaser [et al.] // Am. J. Transplant. – 2005. – Vol. 5, N 2. – P. 341–350.
21. In vivo visualization of early microcirculatory changes following ischemia/reperfusion injury in human kidney transplantation / V. Schmitz [et al.] // Eur Surg Res. – 2008. – Vol. 40, N 1. – P. 19–25.
22. An experimental approach toward chronic pulmonary allograft rejection: Orthotopic lung versus heterotopic tracheal segment transplantation in rats / W. Jungraithmayr [et al.] // Transplant. Proc. – 2010. – Vol. 42, N 7. – P. 2767–2770.
23. Wilkes, D.S. Chronic lung allograft rejection and airway microvasculature: is HIF-1 the missing link? / D.S. Wilkes // J. Clin. Invest. – 2011. – Vol. 121, N 6. – P. 2155–2157.